

マイクロ波の低レベル変調波による妊娠母胎の神経内分泌免疫系への影響

著者	中村 裕之
著者別表示	Nakamura Hiroyuki
雑誌名	平成10(1998)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	1997-1998
ページ	9p.
発行年	1999-03
URL	http://doi.org/10.24517/00051132



マイクロ波の低レベル変調波による妊娠 母胎の神経内分泌免疫系への影響 (09670382)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成11年3月

金沢大学附属図書館



8000-73535-0

研究代表者 中村裕之

(金沢大学医学部助教授)



は し が き

研究組織

研究代表者：中村 裕之（金沢大学医学部助教授）

研究分担者：長瀬 博文（金沢大学医学部講師）

研究分担者：荻野 景規（金沢大学医学部教授）

研究経費

平成9年度	2,000 千円
平成10年度	800 千円
計	2,800 千円

研究発表

(1) 学会誌等

Hiroyuki Nakamura, Toshio Seto, Hirofumi Nagase, Masami Yoshida, Kotaro Hatta, Ichiyo Matsuzaki, Keiki Ogino
Involvement of central neurotensin in thermoregulatory and neuroimmune function in pregnant rats exposed to heat
Brain Behav Immun 11, 141-152, 1997

Hiroyuki Nakamura, Hirofumi Nagase, Masami Yoshida, Keiki Ogino, Toshio Seto, Kotaro Hatta, Ichiyo Matsuzaki
Opioid peptides mediate heat stress-induced immunosuppression during pregnancy
Am J Physiol 274, R672-R676, 1998

Hiroyuki Nakamura, Toshio Seto, Kotaro Hatta, Ichiyo Matsuzaki, Hirofumi Nagase, Masami Yoshida, Keiki Ogino
Central administration of interleukin-1 β reduces natural killer cell activity in non-pregnant rats, but not in pregnant rats
Psychoneuroendocrinology 23, 651-659, 1998

Hiroyuki Nakamura, Toshio Seto, Kotaro Hatta, Ichiyo Matsuzaki, Hirofumi Nagase, Masami Yoshida, Keiki Ogino
Natural killer cell activity reduced by microwave exposure during pregnancy is mediated by opioid systems
Environ Res 79, 106-113, 1998

(2) 口頭発表

中村裕之、長瀬博文、荻野景規、松崎一葉
胎盤 CRH は熱ストレス暴露時のラット子宮胎盤循環動態を制御する
第 69 回日本衛生学会, 平成 11 年 3 月 26 日

研 究 成 果

研究概要

妊娠母胎では、様々な内分泌的变化だけでなく、免疫的变化を伴い、また一方ではストレスなどの外刺激に対する緩衝作用がある。マイクロ波はその温熱作用による様々な影響をもたらすが、妊娠母胎におけるその熱作用に対する神経内分泌免疫系の反応機序の詳細はよく知られていない。また、同時にその低レベル暴露による妊娠母胎の神経内分泌免疫系への影響も不明である。本研究では、低レベルマイクロ波の全身暴露によってもたらされる内分泌免疫系への影響を脳内神経伝達物質との関連において解明することを目的に、マイクロ波（周波数 2,450MHz、強度 2 mW/cm²、90 分間）暴露による脾臓細胞中ナチュラルキラー細胞活性（NKCA）、血中の諸指標と下垂体と胎盤の β -エンドルフィン（ β EP）の変化を妊娠ラットあるいは処女ラットにおいて検討した。このレベルのマイクロ波は、処女ラット、妊娠ラットでそれぞれ、0.8 と 0.9 °C の温度上昇をもたらしたが、血中コルチコステロンへの有意な変化は引き起こさなかった。処女ラットでは認められなかったが、妊娠ラットのマイクロ波暴露群の NKCA は非暴露群に比べ有意に減少した。オピオイド受容体拮抗剤である naloxone の前処置では、妊娠期におけるマイクロ波によって低下した NKCA と視床下部 median eminence の CRH、上昇した PRL を reverse した。一方、CRH 受容体拮抗剤である α -helical CRH の icv 投与によっても同じく、マイクロ波暴露によって上昇した血中プロラクチン（PRL）と下垂体 β EP と、減少した NKCA を reverse した。これらの結果から、妊娠中のマイクロ波暴露による免疫機能低下には、マイクロ波暴露に際して視床下部 CRH 神経系と、視床下部あるいは下垂体のオピオイド神経系が刺激され、その結果、下垂体 PRL が活性化されるという中枢性機序が考えられた。この系の存在により妊娠期では、温熱暴露に際し、細胞性免疫低下によって妊娠期のホメオスターシスを向上させると考えられた。その際のマイクロ波による生体影響は、マイクロ波の温熱作用と非温熱作用の両作用によると考えられた。

マイクロ波の低レベル変調波による妊娠母胎の神経内分泌免疫系への影響—マイクロ波暴露による妊娠ラットの細胞性免疫低下におけるプロラクチンの関与

要 約

妊娠母胎に対する温熱作用については、自律神経-内分泌系だけでなく、免疫系に対しても非妊娠時とは異なる。マイクロ波はその温熱作用による様々な影響をもたらすが、妊娠母胎におけるその熱作用に対する神経内分泌免疫系の反応機序の詳細はよく知られていない。また、同時にその低レベル暴露による妊娠母胎の神経内分泌免疫系への影響も不明である。本研究では、低レベルマイクロ波の全身暴露によってもたらされる内分泌免疫系への影響、特に PRL への影響を脳内神経伝達物質との関連において解明することを目的に、マイクロ波（周波数 2,450MHz、強度 2 mW/cm²、90 分間）暴露による脾臓細胞中ナチュラルキラー細胞活性（NKCA）、血中プロラクチン（PRL）および下垂体の β -エンドルフィン（ β EP）および視床下部 CRH の変化を妊娠ラットにおいて検討した。マイクロ波暴露によって、妊娠ラットの血中コルチコステロンの変化を認めなかったことから、高レベルマイクロ波と異なり、低レベルマイクロ波は視床下部-下垂体-副腎皮質系を活性化させないことが示された。また血中 PRL の上昇、脾臓 NKCA の低下と、視床下部 median eminence の低下を認めた。オピオイド受容体拮抗剤の Naloxone の ip 投与によって、マイクロ波暴露によって上昇した血中 PRL、減少した NKCA と視床下部 median eminence の CRH を reverse した。一方、CRH 受容体拮抗剤である α -helical CRH の icv 投与によっても同じく、マイクロ波暴露によって上昇した血中 PRL と、減少した NKCA、また上昇した下垂体 β EP を reverse した。これらの結果から、妊娠中のマイクロ波暴露による免疫機能低下には、マイクロ波暴露に際して視床下部 CRH 神経系と、視床下部あるいは下垂体のオピオイド神経系が刺激され、その結果、下垂体 PRL が活性化されるという中枢性機序が考えられた。この系の存在により妊娠期では、温熱暴露に際し、細胞性免疫低下によって妊娠期のホメオスタシスを向上させると考えられた。

Key words: β -endorphin; CRH; microwaves; natural killer cell activity; prolactin

マイクロ波は、レーダー、通信、工業用加熱装置をはじめとする様々な産業職場で扱われており、生活環境では家庭用電子レンジ、あるいは通常ではマイクロ波とは直接の関係のない高圧線やコンピュータなどの種々のターミナルディスプレイからもマイクロ波が発生することも知られており (Albrecht, 1978)、その物理的環境因子としての影響を解明することは重要な課題である。マイクロ波による生体影響としては直接的な温熱効果に基づく睾丸や眼球への影響に代表される物理的作用 (Leonard et al, 1983; Lipman et al, 1926)と、情動ストレスをもって非特異的に作用する自律神経-内分泌系への作用 (Inaba et al, 1992; Michaelson et al, 1975)が指摘されているが、妊娠母体や胎児への影響についてはいまだ確立されたとはいえない (Brent, 1989; Michaelson, 1982)。

一方、ストレスによって免疫能が低下することは動物実験のみならず (Morrow Tesch et al, 1993; Shavit et al, 1985)、ヒトにおいても認められ (Locke et al, 1984; Schedlowski et al, 1993)、その応答を神経内分泌免疫機能として近年では捉えられるようになった (Shavit et al, 1985)。コルチコトロピン放出因子 (corticotropin releasing factor, CRH; (Audhya et al, 1991; Perez and Lysle, 1995; Van-Oers et al, 1992)やオピオイドペプチドである β -エンドルフィン (β -endorphin, β EP) (Weber and Pert, 1989)が中枢神経伝達物質として、あるいは内分泌ホルモンとして働き、同時に免疫機能を制御、調節する役割を有することはよく知られており、ストレスに際し視床下部 CRH 神経系が活性化され、下垂体の β EP 分泌を刺激し、免疫系機能低下を引き起こすという機序が想定されている (Morrow Tesch et al, 1993)。プロラクチン (prolactin, PRL) は、当初、下垂体前葉において合成され、分泌されるペプチドで、growth hormone、placental lactogen、proliferin と同じ family に属する (Soares et al, 1991; Southard and Talamantes, 1991)。哺乳類では PRL は乳腺 (Hobbs et al, 1982)、卵巣 (Krasnow et al, 1990)、男性副生殖器 (Nevalainen et al, 1991)などの分泌腺の成長や分化を調節するほか、近年では免疫機能を調節するサイトカインとしての役割に注目されるようになった (Yu Lee, 1997)。高 PRL 血症がナチュラルキラー細胞活性 (natural killer cell activity, NKCA) 低下を伴うこと (Gerli et al, 1986)や、PRL が IL-2 receptor を誘導すること (Mukherjee et al, 1990)、IL-2 や IL-6 の receptor と PRL receptor の間に構造的類似性が高い (Bazan, 1989)ことから、下垂体 PRL が免疫機能に関与するとされている (Reber, 1993)。下垂体 PRL 以外でも、リンパ球内に PRL 様物質が作られ、これが autocrine and paracrine な作用をすることで免疫機能に関与するという証拠も多い (Hiestand et al, 1986; Yu Lee, 1997)。

妊娠期では、恒温性の向上がみられ、また同時に細胞性免疫低下がおこることから、妊娠母胎における自律神経-内分泌系だけでなく免疫系に対する温熱作用は、非妊娠時とは異なる (Nakamura et al, 1997b, 1998)。マイクロ波はその温熱作用による様々な影響をもたらす (Nakamura et al, 1997a)が、妊娠母胎におけるその熱作用に対する神経内分泌免疫系の反応機序の詳細はよく知られていない。また、同時にその低レベル暴露による妊娠母胎の神経

内分泌免疫系への影響も不明である。本研究では、低レベルマイクロ波の全身暴露によってもたらされる内分泌免疫系への影響、特に PRL への影響を脳内神経伝達物質との関連において解明することを目的に、マイクロ波（周波数 2,450 MHz、強度 2 mW/cm²、90 分間）暴露による脾臓細胞中、血中 PRL および下垂体の β EP および視床下部 CRH の変化を妊娠ラットにおいて検討した。その際、オピオイド受容体拮抗剤の Naloxone の ip 投与および CRH 受容体拮抗剤である α -helical CRH の icv 投与によっても、脳内オピオイドと CRH 神経系の関与を明らかにした。

対象および方法

I. 実験対象

実験対象は Wistar 系雌性ラット（SLC、静岡）を用いた。このラットを室温 23±2℃、湿度 50% の環境において 12 時間周期の明暗サイクルの飼育室で、固形試料（オリエンタル固形試料 MF、オリエンタル酵母工業、東京）および水が自由に摂取可能な状態で飼育した。このとき 3-4 群として雌雄ラットを混合飼育し、毎朝産仔内を調べ、精子の確認された雌を妊娠ラットとみなし、この日を妊娠 1 日目とした。妊娠 15-16 日の個体 24 匹を、ip Naloxone 投与実験に供し、また 8-9 日の個体 24 匹を icv α -helical CRH 投与実験に供した。実験時における体重の平均値±標準誤差は、それぞれ、264±6.6 g と 259±6.6 g であった。それぞれの 24 匹のラットを群間に体重差が生じないように各々 6 匹づつの群に分け、Naloxone 投与あるいは α -helical CRH 投与群と、それぞれの Treatment に対する対照のため、saline 投与群を置き、マイクロ波暴露を施す暴露群とこれに対する非暴露群を設けることにより、Naloxone 投与実験で 4 群、 α -helical CRH 投与実験で 4 群をつくった。

Ip Naloxone 投与については、0.2 ml の saline に 2 mg の Naloxone HCl (Sigma, St Louis, MO) を溶かし、マイクロ波暴露 30 前に ip 注射した。対照群には、saline のみ注射した。

Icv の脳手術についての手順については他に述べられているが、Paxinos らの脳図 (Paxinos and Watson, 1986) に従った。脳手術後、1 週間の回復期間を置き、結局、妊娠 15-16 日に icv 投与を行った。 α -helical CRH 投与群に対しては 5 μ g の α -helical CRH (Sigma, St Louis, MO) を 10 μ l の saline に溶かして注入した。対照群では saline のみ注入した。

本実験に使用したラットはすべて金沢大学宝町地区動物実験指針に従い取り扱った。

II. 実験方法

1. マイクロ波暴露

マイクロ波暴露にはマグネトロン ZM53（東芝マグネトロン、東京）により周波数 2,450 MHz の連続波を発生する小動物実験用マイクロ波発生装置 (Inaba et al, 1992) を使用した。マイクロ波暴露の対象となるラットはアクリル製の筒状のホルダーに入れ、ステンレス製のアプリケーション内に置いた。マイクロ波は不要な反射波を抑制するアイソレーターとマイクロ波エネルギー量を測定するカプラーを経由してアプリケーション内に送られ、さらにアプリケーション内でのマイクロ波電磁界が均一なるように金属製の回転翼反射板（スタラー）で撹拌するようにした。さらにアプリケーション内でのマイクロ波に対する負荷が変化することによりエネルギー密度が大きく変動することを防止するためにアプリケーション内に約 300 ml の水をいれたシリコンゴム製の水管を負荷として設置し、エネルギー密度変化が少なくなるように配慮した。マイクロ波の強度は 2 mW/cm² とし、これを室温 23±2℃、湿度 50-60% の実験環境において 90 分間連続暴露した。実験中すべてのラットに水、飼料のいずれも摂取させなかった。

2. 駆幹血の採取と血中コルチコステロン (corticosterone, CS) と PRL の測定

1) 駆幹血の採取

実験終了後直ちに断頭を行い駆幹血を EDTA 50 mM 入りの採血管に採取し、遠心分離 (3000 rpm, 20 分) して血漿を分離後、血中 CS と PRL の測定まで 80℃ で保存した。

2) 血中 CS と PRL の測定

CS の測定には、Silber ら (1958) の蛍光法を用いた。

PRL の測定には、PRL RIA キット DP-1062（第 1 ラジオアイソトープ研究所、東京）を用いた (Fukaya et al, 1983)。すなわち、標準 PRL 溶液および検体 50 μ l を各試験管に分注後、¹²⁵I-PRL 溶液および抗 PRL 家兔血清溶液をそれぞれ 100 μ l 加え、4℃ で 24 時間インキュベーションを行った。次に、沈殿安定剤を加えた抗家兔 γ グロブリン血清溶液 500 μ l を加えて室温で 30 分間インキュベーションを行った。その後、4℃、2000 rpm で 30 分間遠心分離した。上清吸引後、 γ シンチレーションカウンタ ARC-950（アロカ）を用いて計測した。

3. 脾臓細胞中の NK 細胞活性の測定

断頭後、脾臓を摘出し、速やかに Hanks 液 (Gibco, Grand Island, USA) を満たしたシャーレの中で、脾臓組織を細切し、細切組織切片を 2 枚のすりガラスつきスライドガラスの間にはさみ、軽く圧迫して細胞を押し出し、脾細胞浮遊液とした。これを遠心し (4,000 rpm, 20 分)、Hanks 液にて洗浄後、脾細胞を 10% 非動物性胎児血清 (Gibco) を加えた RPMI-1640 液 (Gibco) に浮遊し、 16×10^6 個/ml に調整してエフェクター細胞とした後、 8×10^6 、 4×10^6 、 2×10^6 の計 4 つの希釈列を用意した。標的細胞としての YAC-1 マウス lymphoma 由来細胞株 K562 を 1 mCi/ml の Na²⁵¹CrO₄ (New England Nuclear, Boston, USA) でラベル後、 10^5 個/ml に調整して使用した。各々のエフェクター細胞および K562 細胞を 100 μ l ずつ（この条件下でエフェクター細胞、標的細胞の比はそれぞれ 160:1, 80:1, 40:1, 20:1 になる）をマイクロタイタープレートのウェルに加え、37℃、5% の CO₂ 気相下で 4 時間混合培養後、遠心し (4000 rpm, 20 分)、上清を各穴から 100 μ l 採取し、上清中の ⁵¹Cr 放出量をオートウェルガンマー AR501（アロカ、三鷹）にて測定した。％特異的 ⁵¹Cr 放出値を $100 \times (\text{⁵¹Cr 実測値} - \text{⁵¹Cr 自然放出量}) / (\text{⁵¹Cr 最大放出量} - \text{⁵¹Cr 自然放出量})$ により求めた。⁵¹Cr 自然放出量は、標的細胞のみで培養した際の、また ⁵¹Cr 最大放出量は標的細胞に 1% Triton X-100 を加えた際の ⁵¹Cr 放出量により算定した。その測定は各 3 回行い、その平均値を求めた。ここでエフェクター細胞と標的細胞の比を 160~20:1 とした 4 つ条件から得られる％特異的 ⁵¹Cr 放出値を、Pross ら (Pross et al, 1981) の式にあてはめ、 10^7 個のエフェクター細胞

胞あたりの30%傷害単位 (lytic unit, LU) をNK細胞活性値とし、 $LU_{30}/10^7$ cells で表した。

4. 脳の摘出と分割ならびに視床下部CRHと下垂体の β EPの測定

1) 脳の摘出と分割

脳内物質の測定は視床下部、下垂体の各部分で行い、脳組織の摘出と分割は以下の方法で行った。すなわち、実験終了後に直ちに断頭して全脳を取り出し、氷上で厚さ1mmの前額断切片を作成し、Marleyら(1984)の方法に準じて視床下部と下垂体前葉(anterior pituitary, AP)と神経中間葉(neurointermediate pituitary lobe, NIL)の試料を作成した。視床下部からは、Palkovits and Brownstein(1983)の方法により、median eminence (ME), paraventricular nucleus, periventricular nucleus, medial preoptic nucleus, and lateral preoptic nucleusの5部位の試料を得た。脳組織は氷冷した0.1N酢酸1ml中で超音波破碎し、10分間の煮沸後に2回、遠心分離(4℃, 3000rpm, 20分)を行い、上澄みを凍結乾燥した。遠心分離で得られた沈査は組織蛋白の測定に供した。

2) 脳組織中蛋白の測定

脳組織中のCRHは組織中の蛋白1mgあたりの含有量により評価した。タンパクの定量は、Lowryら(1951)の方法に従った。標準として1N NaOHに溶解した牛血清アルブミンを用いた。

3) 脳組織中CRHと β EPの測定

脳組織を超音波破碎後に乾燥凍結した試料を適当な倍率に希釈し、CRHの測定にはMoldowら(1982)による2抗体法によるRIA法を用いた。CRH抗体については合成 α -CRHと牛血清アルブミンをグルタルアルデヒドで結合させ、それをアジュバントとともに家ウサギ皮内に注射し、 α -CRH抗血清を作成した。このN-tyr- α -CRHをクロラミンT法でヨード化し、内径1cm、長さ50cmのカラムSephadex G-50 (Pharmacia LKB Biotechnology INC., Uppsala, Sweden)で精製した。

β EPの測定には、Yoshimiら(1978)のRIA法を用いた。

5. 統計処理

測定値の統計処理は、マイクロ波暴露の効果とNaloxoneのip投与、あるいは α -helical CRHのicv投与の効果を2元配置分散分析によって解析した。すべての統計処理で有意水準は危険率5% (両側検定) で有意差ありとした。

成 績

Table 1. Effects of microwaves and ip administration of naloxone on blood indicators, splenic NKCA, and pituitary β -endorphin (β EP) in pregnant rats

Exposure	Treatment	Number of rats examined	Values (mean \pm SEM)				
			Blood CS (ng/ml)	Blood PRL (ng/ml)	Splenic NKCA (LU_{30})	β EP in AP (ng/mg protein)	β EP in NIL (ng/mg protein)
No microwave	saline	6	244 \pm 12.2	71.0 \pm 7.00	0.026 \pm 0.0027	510 \pm 50.9	472 \pm 33.3
No microwave	naloxone	6	263 \pm 12.0	71.2 \pm 8.55	0.026 \pm 0.0015	540 \pm 37.4	480 \pm 45.8
Microwave	saline	6	263 \pm 18.4	103 \pm 9.51	0.031 \pm 0.0030	644 \pm 52.9	574 \pm 48.7
Microwave	naloxone	6	260 \pm 17.9	68.7 \pm 5.27	0.045 \pm 0.0040	602 \pm 16.3	577 \pm 26.9

Statistical analysis of difference was performed by two-way ANOVA. Significant main effects of microwaves on blood PRL ($F(1, 20) = 4.44$, $p < 0.05$), splenic NKCA ($F(1, 20) = 5.94$, $p < 0.05$), β EP in AP ($F(1, 20) = 6.51$, $p < 0.05$), NIL ($F(1, 20) = 7.49$, $p < 0.05$), naloxone administration on blood PRL ($F(1, 20) = 5.95$, $p < 0.05$) and interactive effect on blood PRL ($F(1, 20) = 6.06$, $p < 0.05$), splenic NKCA ($F(1, 20) = 5.57$, $p < 0.05$).

Table 2. Effects of microwaves and ip administration of naloxone on CRH in the discrete regions of the hypothalamus in pregnant rats

Rat group	Treatment	Number of rats examined	CRH (mean \pm SEM, ng/mg protein)				
			Median eminence	Paraventricular nucleus	Periventricular nucleus	Medial preoptic nucleus	Lateral nucleus
No microwave	saline	6	3.30 \pm 0.20	0.45 \pm 0.048	0.30 \pm 0.026	0.14 \pm 0.010	0.15 \pm 0.008
No microwave	naloxone	6	3.14 \pm 0.29	0.40 \pm 0.020	0.37 \pm 0.055	0.13 \pm 0.012	0.15 \pm 0.013
Microwave	saline	6	2.21 \pm 0.30	0.41 \pm 0.041	0.37 \pm 0.038	0.14 \pm 0.010	0.18 \pm 0.010
Microwave	naloxone	6	3.09 \pm 0.26	0.39 \pm 0.025	0.34 \pm 0.014	0.14 \pm 0.006	0.15 \pm 0.016

Statistical analysis of difference was performed by two-way ANOVA. Significant main effects of microwaves on CRH in median eminence ($F(1, 20) = 5.62$) and interactive effect on CRH in median eminence ($F(1, 20) = 4.70$, $p < 0.05$).

1. Naloxone 投与実験

表1には、Naloxoneのip投与とマイクロ波暴露による血中CS、PRL、脾臓NKCAと下垂体APとNILの β EPへの影響を示した。2元配置分散分析によって、血中PRLに対すNaloxoneのip投与の有意な主効果を、またマイクロ波暴露による血中PRL、脾臓NKCAと下垂体AP、NILの β EPに対する有意な主効果を認めた。またip投与と暴露の有意な交互作用が、PRLとNKCAに対して認められた。表2には、視床下部5部位に対するNaloxoneのip投与とマイクロ波暴露の影響を示す。暴露の有意な主効果と暴露とip投与の有意な交互作用がMEに対して認め

られた。

2. α -helical CRH 投与実験

表3には、 α -helical CRH の icv 投与とマイクロ波による血中 PRL、脾臓 NKCA と下垂体 AP と NIL の β EP への影響を示した。血中 PRL、脾臓 NKCA と下垂体 AP と NIL の β EP に対して、マイクロ波暴露と α -helical CRH の icv 投与による有意な主効果のみならず、これらによる有意な交互作用も認められた。

Table 3. Effects of microwaves exposure and icv administration of α -helical CRH on prolactin (PRL), β -endorphin (β EP) in anterior pituitary lobe (AP) and neurointermediate pituitary lobes (NIL), and splenic natural killer cell activity (NKCA) in pregnant rats.

Exposure	Treatment	Number of rats examined	Values (mean \pm SEM)			
			Blood PRL (ng/ml)	Splenic NKCA (LU ₅₀)	β EP in AP (ng/mg protein)	β EP in NIL (ng/mg protein)
No microwave	Control	6	74.3 \pm 6.19	6.38 \pm 0.62	430 \pm 20.7	466 \pm 20.5
No microwave	α -helical CRH	6	70.5 \pm 5.97	6.32 \pm 0.68	450 \pm 16.0	488 \pm 41.7
Microwaves	Control	6	104 \pm 7.60	4.13 \pm 0.35	532 \pm 20.9	625 \pm 41.8
Microwaves	α -helical CRH	6	74.0 \pm 5.33	6.61 \pm 0.25	427 \pm 21.0	477 \pm 20.8

Statistical analysis of difference was performed by two-way ANOVA. Significant main effects of microwaves on blood PRL ($F(1, 20) = 8.00$, $p < 0.05$), splenic NKCA ($F(1, 20) = 4.44$, $p < 0.05$), β EP in AP ($F(1, 20) = 6.07$, $p < 0.05$), NIL ($F(1, 20) = 4.73$, $p < 0.05$), α -helical CRH administration on blood PRL ($F(1, 20) = 8.33$, $p < 0.01$), splenic NKCA ($F(1, 20) = 6.81$, $p < 0.05$), β EP in AP ($F(1, 20) = 4.47$, $p < 0.05$), NIL ($F(1, 20) = 5.48$, $p < 0.05$) and interactive effect on blood PRL ($F(1, 20) = 4.94$, $p < 0.05$), splenic NKCA ($F(1, 20) = 7.58$, $p < 0.05$), β EP in AP ($F(1, 20) = 8.01$, $p < 0.05$), NIL ($F(1, 20) = 12.0$, $p < 0.01$).

考 察

ストレスが細胞性免疫の低下をもたらす機序としては、視床下部 CRH を中心とした視床下部-下垂体-副腎皮質系が中心とされるが (Audhya et al, 1991; Van-Oers et al, 1992)、内因性オピオイド (Weber and Pert, 1989) や PRL もその役割を有することも知られている。特に PRL については、ストレスに際しては、CRH を介して、下垂体から ACTH や β EP とともに放出され (Akema et al, 1995)、その下垂体 PRL が細胞性免疫低下をもたらす (Dantzer and Kelley, 1989; Matera, 1997) こと以外にも、リンパ球から合成、分泌される PRL (Pellegrini et al, 1992; Sabharwal et al, 1992) が免疫能に関与することも近年では知られるようになった。本結果では、マイクロ波暴露による妊娠ラットの NKCA の低下と PRL の上昇がともに認められたことから、妊娠期におけるマイクロ波暴露による細胞性免疫能低下に際して、PRL の関与の可能性を示唆している。本結果では、マイクロ波暴露によって、妊娠ラットの血中コルチコステロンの変化を認めなかったことから、高レベルマイクロ波と異なり、低レベルマイクロ波は視床下部-下垂体-副腎皮質系を活性化させないことから、その細胞性免疫能低下に際して、視床下部-下垂体-副腎皮質系の関与の可能性は低いと思われる。

内因性オピオイドペプチドは、ストレス時の PRL の放出を促進する (Petraglia et al, 1987; Rossier et al, 1980; Van Vugt et al, 1978)。dopamine が arcuate nucleus や median eminence における PRL 放出を抑制することはよく知られている (Ben Jonathan et al, 1989)。オピオイドペプチドが PRL 放出を促すのは、ドパミン神経系の活性、放出、合成を抑制するとされている (Van et al, 1979) (Van Loon et al, 1980)。妊娠期でも内因性オピオイドペプチドは、Nocturnal PRL surge を調節するとされている (Sagrillo and Voogt, 1991)。このようなオピオイドと PRL の関係を元に考えれば、オピオイド受容体拮抗剤の Naloxone の ip 投与によって、マイクロ波暴露によって上昇した血中 PRL と減少した NKCA を reverse した本結果は、妊娠期においても、オピオイド神経系が PRL による NKCA の低下という経路を制御していることを示唆している。

元来、内因性オピオイドによる PRL 放出には、中枢神経系 (central nervous system, CNS) 内で行われることが、in vitro では、内因性オピオイドは下垂体 PRL の放出をもたらさないこと (Grandison and Guidotti, 1977; Rivier et al, 1977) や、オピオイド由来物質は、血液-脳関門を通過しないため、その末梢投与によっては PRL の放出増加をきたさないこと (Panerai et al, 1981) で証明されてきた。Naloxone の ip 投与によって、マイクロ波暴露によって上昇した視床下部 ME の CRH を reverse したため、CNS、特に、ME が中心となってオピオイドによる PRL の上昇と NKCA の低下が妊娠期のマイクロ波暴露時では生じることが窺い知れる。CRH 受容体拮抗剤である α -helical CRH の icv 投与によっても同じく、マイクロ波暴露によって上昇した血中 PRL と、減少した NKCA、また上昇した下垂体 β EP を reverse した本結果はこのことを裏付ける。ところが、妊娠に伴って胎盤が形成されると、胎盤から CRH とならんで PRL が合成され、生理的物質として paracrine で autocrine な作用を営む (Handwerger et al, 1991; Maaskant et al, 1996)。また胎盤 PRL が胎盤から母体血中に入り、血中 PRL の増加として観察される (Anthony et al, 1995)。し

たがって、妊娠時のマイクロ波暴露によって **opioid receptor antagonist** の末梢投与によって血中 PRL が減少した本結果は、下垂体以外の部位、すなわち、胎盤に対する作用も否定できなくはない。この胎盤由来の PRL の関与については今後の研究によって明らかになると考えられる。

結 論

以上の結果から、妊娠中のマイクロ波暴露による免疫機能低下には、マイクロ波暴露に際して視床下部、特に ME の CRH 神経系と、視床下部あるいは下垂体のオピオイド神経系が刺激され、その結果、下垂体 PRL が活性化されるという中枢性機序が考えられた。この系の存在により妊娠期では、温熱暴露に際し、細胞性免疫低下によって妊娠期のホメオスタシスを向上させると考えられた。

文 献

- Akema T, Chiba A, Oshida M, Kimura F, Toyoda J: Permissive role of corticotropin-releasing factor in the acute stress-induced prolactin release in female rats. *Neurosci Lett* 198; 146-148, 1995
- Albrecht RM: Microwave radiation: an epidemiologic assessment. *Rev Environ Health* 8: 43-58, 1978
- Anthony RV, Pratt SL, Liang R, Holland MD: Placental-fetal hormonal interactions: impact on fetal growth. *J Anim Sci* 73: 1861-1871, 1995
- Audhya T, Jain R, Hollander CS: Receptor-mediated immunomodulation by corticotropin-releasing factor. *Cell Immunol* 134: 77-84, 1991
- Bazan JF: A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 788-795, 1989
- Ben Jonathan N, Arbogast LA, Hyde JF: Neuroendocrine [corrected] regulation of prolactin. *Prog Neurobiol* 33: 399-447, 1989
- Brent RL: The effect of embryonic and fetal exposure to x-ray, microwaves, and ultrasound: counseling the pregnant and nonpregnant patient about these risks. *Semin Oncol* 16:347-368, 1989
- Dantzer R, Kelley KW: Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci* 44: 1995-2008, 1989
- Fukaya T, Furuhashi N, Shinkawa I, Takahashi T: [Fundamental evaluation of rapid prolactin RIA kit (DP-1062)]. *Hormon To Rinsho* 31: 583-587, 1983
- Gerli R, Rambotti P, Nicoletti I, Orlandi S, Migliorati G, Riccardi C: Reduced number of natural killer cells in patients with pathological hyperprolactinemia. *Clin Exp Immunol* 64: 399-406, 1986
- Grandison, L, Guidotti A: Regulation of prolactin release by endogenous opiates. *Nature* 270: 357-359, 1977
- Handwerker S, Markoff E, Richards R: Regulation of the synthesis and release of decidual prolactin by placental and autocrine/paracrine factors. *Placenta* 12: 121-130, 1991
- Hiestand PC, Mekler P, Nordmann R, Grieder A, Permmongkol C: Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporine. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2599-2603, 1986
- Hobbs AA, Richards DA, Kessler DJ, Rosen JM: Complex hormonal regulation of rat casein gene expression. *J Biol Chem* 257: 3598-3605, 1982
- Inaba R, Shishido K, Okada A, Moroji T: Effects of whole body microwave exposure on the rat brain contents of biogenic amines. *Eur J Appl Physiol* 65: 124-128, 1992
- Krasnow JS, Hickey GJ, Richards JS: Regulation of aromatase mRNA and estradiol biosynthesis in rat ovarian granulosa and luteal cells by prolactin. *Mol Endocrinol* 4: 13-12, 1990
- Leonard A, Berteaud AJ, Briyere A: An evaluation of the mutagenic, carcinogenic and teratogenic potential of microwaves. *Mutat Res* 123: 31-46, 1983
- Lipman RM, Tripathi BJ, Tripathi RC: Cataracts induced by microwave and ionizing radiation. *Surv Ophthalmol* 33: 200-210, 1926
- Locke SE, Kraus L, Leserman J, Hurst MW, Heisel JS, Williams RM: Life change stress, psychiatric symptoms, and natural killer cell activity. *Psychosom Med* 46: 441-453, 1984
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- Maaskant RA, Bogic LV, Gilger S, Kelly PA, Bryant Greenwood GD: The human prolactin receptor in the fetal membranes, decidua, and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 396-405, 1996
- Marley PD, Rehfeld JF, Emson PC: Distribution and chromatographic characterisation of gastrin and cholecystokinin in the rat central nervous system. *J Neurochem* 42: 1523-1535, 1984
- Matera L: Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulation* 4: 171-180, 1997
- Michaelson SM: Health implications of exposure to radiofrequency/microwave energies. *Br J Ind Med* 39: 105-119, 1982
- Michaelson SM, Houk WH, Lebda NJA, Lu ST, Magin R: Biochemical and neuroendocrine aspects of exposure to microwaves. *Ann NY Acad Sci* 247: 21-25, 1975
- Moldow RL, Fischman AJ: Radioimmunoassay of CRF-like material in rat hypothalamus. *Peptides* 3: 37-39, 1982
- Morrow Tesch JL, McGlone JJ, Norman RL: Consequences of restraint stress on natural killer cell activity, behavior, and hormone levels in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Psychoneuroendocrinology* 18: 383-395, 1993
- Mukherjee P, Mastro AM, Hymer WC: Prolactin induction of interleukin-2 receptors on rat splenic lymphocytes. *Endocrinology* 126: 88-94, 1990
- Nakamura H, Nagase H, Yoshida M, Ogino K, Seto T, Hata K, Matsuzaki I: Opioid peptides mediate heat stress-induced immunosuppression during pregnancy. *Am J Physiol* 274: R672-R676, 1998
- Nakamura H, Seto T, Nagase H, Yoshida M, Dan S, Ogino K: Effects of exposure to microwaves on cellular immunity and placental steroids in pregnant rats. *Occup Environ Med* 54: 676-680, 1997

- Nakamura H, Seto T, Nagase H, Yoshida M, Hatta K, Matsuzaki I, Ogino K: Involvement of central neurotensin in thermoregulatory and neuroimmune function in pregnant rats exposed to heat. *Brain Behav Immun* 11: 141-152, 1997
- Nevalainen MT, Valve EM, Makela SI, Blauer M, Tuohimaa PJ, Harkonen PL: Estrogen and prolactin regulation of rat dorsal and lateral prostate in organ culture. *Endocrinology* 129: 612-622, 1991
- Palkovits M, Brownstein MJ: Microdissection of brain areas by the punch technique. In: AC Cuello (ed.) *Brain Microdissection Techniques*. Wiley, New York, 1983, pp 1-36
- Panerai AE, Casanueva F, Martini A, Mantegazza P, Di Giulio AM: Opiates act centrally on GH and PRL release. *Endocrinology* 108: 2400-2402, 1981
- Paxinos G, Watson C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed.* Academic Press, New York, 1986
- Pellegrini I, Lebrun JJ, Ali S, Kelly PA: Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. *Mol Endocrinol* 6: 1023-1031, 1992
- Perez L, Lysle DT: Corticotropin-releasing hormone is involved in conditioned stimulus-induced reduction of natural killer cell activity but not in conditioned alterations in cytokine production or proliferation responses. *J Neuroimmunol* 63: 1-8, 1995
- Petraglia F, Vale W, Rivier C: Beta-endorphin and dynorphin participate in the stress-induced release of prolactin in the rat. *Neuroendocrinology* 45:338-342, 1987
- Pross HF, Baines MG, Rubin P, Shragge P, Patterson MS: Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX. The quantitation of natural killer cell activity. *J Clin Immunol* 1: 51-63, 1981
- Reber PM: Prolactin and immunomodulation. *Am J Med* 95: 637-644, 1993
- Rivier C, Vale W, Ling N, Brown M, Guillemin R: Stimulation in vivo of the secretion of prolactin and growth hormone by beta-endorphin. *Endocrinology* 100: 238-243, 1977
- Rossier J, French E, Rivier C, Shibasaki T, Guillemin R, Bloom FE: Stress-induced release of prolactin: blockade by dexamethasone and naloxone may indicate beta-endorphin mediation. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 666-669, 1980
- Sabharwal P, Glaser R, Lafuse W, Varma S, Liu Q, Arkins S, Kooijman R, Kutz L, Kelley KW, Malarkey WB: Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7713-7716, 1992
- Sagrillo CA, Voegt JL: Endogenous opioids mediate the nocturnal prolactin surge in the pregnant rat. *Endocrinology* 129: 925-930, 1991
- Schedlowski M, Jacobs R, Stratmann G, Richter S, Hadicke A, Tewes U, Wagner TO, Schmidt RE: Changes of natural killer cells during acute psychological stress. *J Clin Immunol* 13: 119-126, 1993
- Shavit Y, Terman GW, Martin FC, Lewis JW, Liebeskind JC, Gale RP: Stress, opioid peptides, the immune system, and cancer. *J Immunol* 135: 834, 1985
- Silber RH, Busch RD, Oslapas R: Practical procedure for estimation of corticosterone or hydrocortisone. *Clin Chem* 4: 278-285, 1958
- Soares MJ, Faria TN, Roby KF, Deb S: Pregnancy and the prolactin family of hormones: coordination of anterior pituitary, uterine, and placental expression. *Endocr Rev* 12: 402-423, 1991
- Southard JN, Talamantes F: Placental prolactin-like proteins in rodents: variations on a structural theme. *Mol Cell Endocrinol* 79: C133-C140, 1991
- Van Loon GR, De Souza EB, Shin SH: Dopaminergic mediation of beta-endorphin-induced prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 31: 293-296, 1980
- Van-Oers JW, Hinson JP, Binnekade R, Tilders FJ: Physiological role of corticotropin-releasing factor in the control of adrenocorticotropin-mediated corticosterone release from the rat adrenal gland. *Endocrinology* 130: 282-288, 1992
- Van Vugt DA, Bruni JF, Meites J: Naloxone inhibition of stress-induced increase in prolactin secretion. *Life Sci* 22: 85-89, 1978
- Weber RJ, Pert A: The periaqueductal gray matter mediates opiate-induced immunosuppression. *Science* 245: 188-190, 1989
- Yoshimi H, Matsukura S, Sueoka S, Fukase M, Yokota M, Hirata Y, Imura H: Radioimmunoassay for beta-endorphin: presence of immunoreactive "big-big" beta-endorphin ("big" beta-lipotropin) in human and rat pituitaries. *Life Sci* 22: 2189-2195, 1978
- Yu Lee LY: Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 215: 35-52, 1997